دراسة الثبات الوراثي لنبيتات البطاطا المزروعة خارج الجسم الحي بعد سنوات من الزراعة المتكررة باستخدام تقانة التفاعل التضاعفي العشوائي للحامض النووي DNA ♦

خلود إبراهيم حسن
قسم علوم الأغذية/كلية الزراعة
جامعة السليمانية

جلادت محمد صالح
قسم علوم الحياة/كلية العلوم
جامعة دهوك

Abstract

Random Amplified Polymorphic DNA markers were used to evaluate the genetic stability of micro propagated plants of potato (*Solanum tuberosum*) var.Desiree .To achieve this genomic DNA was extracted from the samples to comparison between the DNA of plantlet micro propagated through meristem culture and the DNA of the plantlets (7 samples) after sub culturing 16 times, beside the comparison within the samples.

Fifteen arbitrary primers were used to amplify DNA from the samples, to assess the genetic stability .All RAPD profiles from micro propagated plants were mono morphic and similar to the DNA of the origin sample .no variation was detected within the micro propagated plants, this prove that potato plants used in this study were resistant to somaclanal variation and utilization of RAPD markers for the assessment of genetic stability.

الخلاصة

لدراسة الثبات الوراثي لنبيتات البطاطا المزروعة خارج الجسم الحي في الزراعة النسيجية بعد عدة سنوات من الزراعة المتكررة تم استخدام مؤشرا ت التفاعل التضاعفي العشوائي لسلسلة الDNAالمعتمدة على التفاعل العشوائي لسلسلة ال DNA. اذ استندت خطة البحث على استخلاص الDNA من نبيتات البطاطا الناتجة من زراعة المرستيم القمي دون الدخول بمرحلة الكالس ومن ثم مقارنتها بالDNA المستخلص من النبيتات بعد 16 مرة من الزراعة المتكررة اي حوالي سنتين بالاضافة الى المقارنة ضمن العينات ، وذلك باختيار 7 نماذج عشوائية منها ، اذ تم استخدام 15 بادئ من البوادئ العشوائية المستخدمة في هذا النوع من المؤشرات ولم تنتج 5 منها اي نواتج تضاعف في حين اعطت بقية البوادئ نواتج تضاعف مشتركة من ناحية عدد الحزم واحجامها الجزيئية ضمن وبين العينات وبين عينة

♦ البحث ملقى في المؤتمر الأول لعلوم الحياة في كلية التربية جامعة الموصل للفترة 4-5 أيلول 2007

الDNA الاصلية وهذا يدل على عدم ظهور تغابرات وراثية بين العينات وكذلك على امكانية استخدام المؤشرات الوراثية اعلاه لتوثيق الثبات الوراثي للنبيتات المزروعة نسيجيا.

المقدمة

تعد البطاطا(*Solanum tuberosum*) من النباتات المهمة اقتصاديا اذ تاتي بالمرتبة الرابعة بعد الحنطة والرز والذرة من ناحية الانتاج العالمي ومن اهم المحاصيل الدرنية في العالم (1) تكمن اهمية البطاطا في قيمتها الغذائية العالية وخاصة محتواها من البروتين . يتكاثر النبات عادة بشكل خضري عن طريق زراعة الدرنات وان تكاثر النبات عن طريق البذور يكون محدودا بسبب كون العدد الاكبر من الاصناف عقيما او قليل الخصوبة ، كذلك فان الاكثار الخضري المستمر لبعض النباتات كالبطاطا يسبب تدهور النباتات بفعل الاصابة المرضية ، ولتامين الحصول على نباتات خالية من المسببات المرضية (البكترية والفطرية) يتم اللجوء الى زراعة المرستيم القمي للبطاطا ضمن تقانة الزراعة النسيجية والتي تمثل البديل الاكفا في الحصول على اعداد كبيرة من النباتات الخالية من المسببات المرضية خاصة بعد اقترانها بتقانة الاليزا (Enzyme Linked Immanosorbent Assay) لضمان خلوها من المسببات الفايروسية ايضا. ولكن تظهر النبيتات الناتجة من الزراعة خارج الجسم الحي بعض التغايرات الوراثية (Somaclonal variation) والتي تكون عادة موروثة وغير مرغوبة (3) لذلك يتم اللجوء الى وسائل او انظمة تقلل بشكل ملحوظ تلك التغايرات، ويرجع حجم التغايرات الى النوع النباتي،والبطاطا كغيره من الانواع النباتية يتعرض الى هذه التغايرات الوراثية عند زراعتها خارج الجسم الحي (4) وكان لابد من وجود وسيلة للكشف عن تلك التغايرات، وحيث ان الدراسات السايتولوجية (cytological analysis) غير قادرة على الكشف عن التغايرات في جينات معينة او الكشف عن تغيير بسيط في الكروموسومات (5) كما تكون المؤشرات الوراثية المعتمدة على البروتينات مرتبطة بمرحلة معينة وبنسيج معين بالاضافة الى قلة اعدادها باعتبار ان البروتين هو الناتج المباشر للجين، لذلك تم اللجوء الى نوع اخر من المؤشرات هي المؤشرات التي تستطيع الكشف عن التغايرات الوراثية على مستوى الDNA تلك هي مؤشرات ال DNAوالتي تمتاز بكثرة اعدادها وعدم تاثرها بالبيئة ونوع النسيج (6) وتم اختيار مؤشرات التضاعف العشوائي المتعددالاشكال اوالRAPD (Randomly Amplified Polymerase DNA) والمعتمدة على التفاعل التضاعفي لسلسلة الـ DNA اوالـ PCR (Polymerace Chain Reaction) المكتشفة من قبل [7] Williams et al والتي تمتاز باستخدامها بادئات عامة قصيرة (10نيكلوتيدات) وامكانية تطبيقها على اي كائن دون الحاجة الي المعرفة المسبقة لتسلسل الDNA وعدم احتياجها الى

النظائر المشعة ولذلك استخدمت اخيرا وبشكل كبير للكشف عن التغايرات الموجودة بين الانواع وبين الافراد التابعة للنوع الواحد كما تم استخدام مؤشرات ال RAPD وبنجاح لدراسة الثبات الوراثي للاجنة الجسمية في انواع القوع Spruce (5) وبين نبيتات القوغ poplur المكثرة خارج الجسم الحي(8) وفي هذه الدراسة تم تطبيق مؤشرات ال RAPD لدراسة الثبات الوراثي لنبيتات البطاطا صنف Desiree بعد الزراعة المتكررة خارج الجسم الحي للكشف عن التغايرات الوراثية بين أفراد النوع الواحد.

المواد وطرائق العمل

تم اجراء التجربة في المختبرات العلمية التابعة لوزارة الزراعة في بغداد ؛ وان تحضير النماذج يعتمد على استحداث الزروعات (sprouts) في درنات البطاطا صنف Desiree ذلك عن طريق انبات البراعم وبعدها تم عزل المرستيم القمي بطول 0.1-0.3 ملم مع زوج من بادئات الاوراق وزراعته على الوسط الغذائي MS(Marashing and Soog) والمحورة ,والذي يشبه الوسط MS من حيث محتواه من الاملاح ولكن محتواه من الفيتامينات والهرمونات لكل لتركانت كالاتي :4 مل من كل من الكلايسين والاينوسيتول و2مل من اندول حامض الخليك (IAA) و1مل من كل من حامض النيكوتيك والكاينتين والبايرودوكسين، و 0.2مل من الثايمين وبعد وصول النبيتات الى الحجم المناسب بعد تحضيهنا على25 م ولمدة 5 اسابيع، تم تقطيع النبتة الجديدة الى عدة عقل (3-4) وزراعتها داخل الانابيب وذلك للحصول على نباتات متماثلة وراثيا وخالية من المسببات المرضية (البكتريا ،الفطريات) ولضمان خلوها من الاصابة الفايروسية ، تم فحص عينة من كل صنف اعتمادا على طريقة Clarck and Adamوبظهور نتائج الفحص تم ابعاد النباتات المصابة بانواع الفايروسات المدروسة(Y.S.M.A.X.) واعادة زراعة القمة النامية ،اما النباتات السليمة فيتم اكثارها مرة اخرى للحصول على 6-10 نبيتات تكون كافية لاستخلاص الDNA منها وذلك لتكوين 3غم من الاوراق الطرية .

عزل الـDNA(DNA Extraction)

تمت عملية عزل الDNA وفقا لطريقة Weigand et al,[6] المعتمدة على مادة ال CTAB (Cetal Trimethyl Ammonium Bromide) . تؤخذ 2-3 غم من الاوراق الطريـة للنبيتات (6-10) وتطحن بوجود النتروجين السائل ثم تنقل الى دوارق زجاجية تحوي علـى 10 مل من محلول ال CTAB (يحوي اللترمن المحلول على 20 غم من المادة مع 280مل من كلوريد الصوديوم (5 مولار) و100 مل من ال Tris-Hcl و40مل من ال EDTA) لمدة ساعة ثم يضاف لكل دورق 6 مل من محلول الكلوروفورم ايزواميل (1:24) لمدة ربع ساعة

،ينبذ المزيج بجهاز النبذ المركزي وناخذ الطبقة العليا الحاوية على معقد CTAB مع الـDNA ويرسب باستخدام نفس الحجم من محلول الايزوبروبانول مع 10/1 من الحجم من استيت الصوديوم (3 مولاري)، بعد النبذ المركزي لمدة 10 دقائق يتم غسل الدنا المترسب بالايثانول 70% يخفف ويذوب في 10 ملي مولار من الترس القاعدي و 0.1 ملي مولار EDTA,ويمكن تقدير تركيز الدنا باستخدام المطياف الضوئي عند الطول الموجي 260 نانوميتر.

تحضير تفاعلات الـ RAPD

تم استخدام 15 بادئ المصنعة من قبل شركة Operon technologies لاستخدامها ضمن تفاعلات الـ RAPD التي تم تخضيرها استنادا على طريقة Williams,et al [7] مع تحويرات بسيطة ،وتم تحضير خليط التفاعل الرئيسي بمزج المكونات التالية في انبوبة واحدة وبحجم 25مايكروليتر: 2.5 مايكروليتر محاول منظم بقوة 10X ،2.5 مايكروليتر من الـ dNTPs(100 ملي مولار)،.2 مايكروليتر من البادى (10 بيكومول) ،0.2 مايكروليتر من انزيم الـ Taq – DNA polymerase (وحدة واحدة)،2 مايكروليتر من كلوريد المغنيسيوم(1.6 ملي مولر) و25 نانوغرام من الدنا (2 مايكرولبتر) ليصبح الخجم النهائي 25 مايكروليتر تغطى بفطرة من الزيت (mineral oil) وتدخل داخل المبلمر الحراري (thermocycler) ،تم التفاعل وقف البرنامج التالي : دورة واحدة لمدة 2 دقيقة على درجة حرارة 94 م للمسخ الاولي لشريط الدنا(denaturation) تليها 40 دورة تضاعف تتضمن كل دورة (:دقيقة واحدة على درجةحرارة 92 م لمسخ الدنا ودقيقة واحدة على درجة 36 م لربط البادئات بالدنا و2 دفيفة على درجة حرارة 72 م لاستطالة البادئات المرتبطة مع دورة اخيرة واحدة للاستطالة النهائيةلمدة 10 دقائق على درجة حرارة 72 م° .

يتم تحضير هلام الاكاروز(1.2%) ويتم تحميل العبنات بالحفر مع الدليل الحجمي المتكون من دنا العاثي لادبدا المقطوع بانزيم الـ Hind III ولمدة 4-5 ساعات .ويتم فحص الهلام بصبغة بروميد الاثيديوم وتحت ا لاشعة فوق البنفسجية

تحليل تفاعلات الـRAPD

استندت خطة البحث على اساس مقارنة عينة الـ DNA المستخلصة من البينتات مع عينة الـ DNA لنفس النبيتات بعد تكرار زرعها 10-12مرة اولا والمقارنة بين 7 نماذج عشوائية لنفس النبيتات (مقارنة ضمن العينات)لدراسة احتمالية وجود التباينات بين الافراد الناتجة من الزراعة المتكررة، ثانيا. تمت المقارنة على اساس الاختلاف في أعداد وأحجام القطع المتضاعفة و تم اهمال الحزم الخفيفة.

النتائج والمناقشة

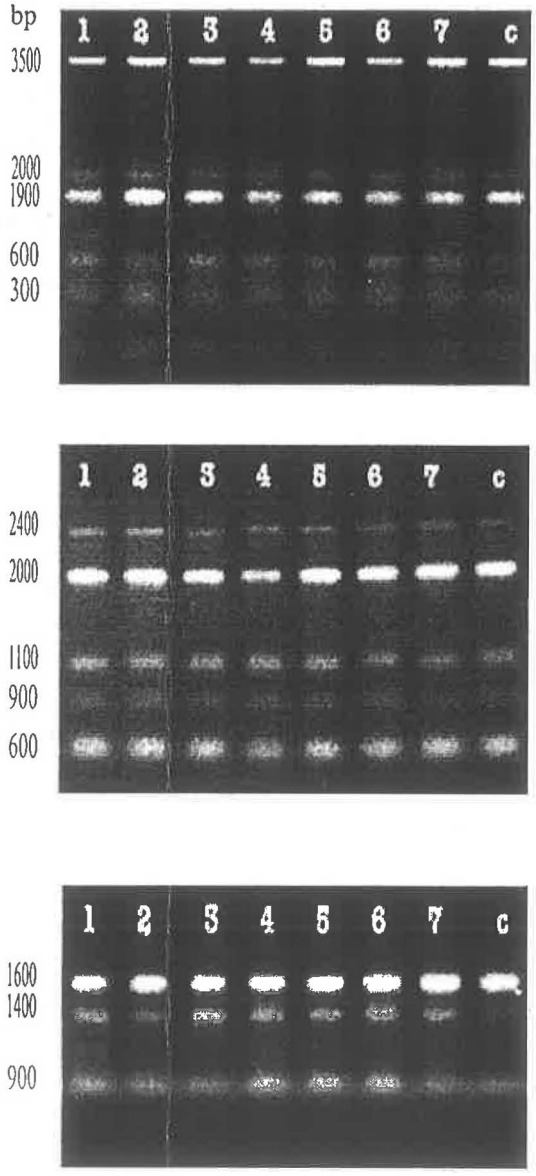
بعد ان تم الحصول على الظروف المثالية لعزل الDNA من النبيتات الملائمة لتفاعلات ال RAPDتم تحليل النتائج إذ تم اختيار 15 بادىء (بعشرة نيوكليوتيدات)اذ لم تظهر 5 بادئات منها اية نواتج تضاعف وهي البادئات: OPE.07 OPF.10 OPK.18 OPM.08 OPE.04 وذلك بسبب غياب المواقع المكملة لتسلسلات تلك البادئات ضمن مجين البطاطا وهذا يتفق مع 8والذي لم يحصل على نواتج تضاعفعند تطبيق مواشرات ال RAPD باستخدام بعض البادئات على نبات الحمص اما بقية البادئات فقد اظهرت نواتج تضاعف متشابهة بين جميع العينات المدروسة والتي ظهرت على شكل حزم مشتركة mono morphic (bands) باستخدام البادئات OPC.12, OPN.11, OPP.18, OPX.15, OPN.05, OPP.08 OPT.08, OPC.02 OPC.10, و OPX.09 تراوح عدد الحزم المتضاعفة من ثلاثة حزم فى البادئات OPX.15 OPP.08 OPC.10 OPC.02, و OPN.11 الى 7 حزم في البادئ OPN.05 ..و يذكر ان اختلاف عدد الحزم يعتمد على عدد وطبيعة مواقع ارتباط البادئ بقالب ال DNA .

كذلك اختلفت احجام القطع المتضاعفة باختلاف البادئ (الجدول 1) وتراوحت بين 400 كيلو قاعدة في البادئ OPL.03 الى 3500 كيلو قاعدة في البادئ OPT.08. وان حجم القطعة المتضاعفة يستند على البعد بين مواقع ارتباط البادئ على شريطي الDNA القالب اي انها تساوي المنطقة المحصورة بين مواقعي الارتباط تلك وبما ان تلك المواقع منتشرة على المجين بشكل عشوائي فان حدوث اي تغيير في تسلسل النيوكليوتيدات يسبب تغيير في احدى مواقع الارتباط بالبادىء وبالتالي تودي الى تغيير حجم القطعة المتضاعفة والذي يجب ان يكون ضمن قدرة الانزيم المستخدم في هذه التفاعلات وهو انزيم ال Taq DNA polymerase وان الحصول على الحزم المشتركة بين العينات يدل على عدم وجود اختلاف في تسلسل ال DNA للعينات المدروسةو بالتالي تماثل العينات. وفي دراسات اخرى تم الحصول على حزم مشتركة بين النبيتات ا لمكثرة خارج الجسم الحي باستخدام بادئات مختلفة (2,7)ولم تظهراي تباينات في عدد واحجام القطع المتضاعفة بتطبيق مؤشرات الRAPDبين نباتات G inger لمكثرة خارج الجسم الحي (10) ولقد ذكر[11] Shenoy and Vasil بعدم وجود تغايرات وراثية بين النبيتات المكثرة من خلال زراعة المرستيم القمي وذلك لان انسجة المرستيم تكون اكثر مقاومة للتغايرات الوراثية التى قد تظهر خلال انقسام الخلايا واثناء التمايز لتلك الخلايا خارج الحسم الحي . وفي هذه الدراسة كانت النواتج المتضاعفة متساوية في اعدادها واحجامها وباستخدام جميع البادئات بين عينة الDNA الاصلية

والعينات العشوائية (السبعة) للDNA للنبيتات بعد عدة مرات من الزراعة المتكررة كذلك لم تكن هنالك اية اختلافات في اعداد واحجام القطع المتضاعفة ضمن تلك العينات مما يدل على تماثلها و احتفاظها بنفس المعلومات الوراثية وهذا يتفق مع ما توصل اليه2 بعدم وجود تغايرات في بصمة ال RAPD .بين نباتات الGassava المزروعة من المرستيم القمي خارج الجسم الحي. وهذا يثبت كون مؤشرات ال RAPD تعتمد على تقانة بسيطة وناجحة ويمكن الحصول من خلالها على نتائج قابلة للتكرارولذلك اعتمدت كثيرا وخاصة في الفترة الاخيرة لدراسة التغايرات ضمن الاصناف (Intraclonal variation) في العديد من الانواع النباتية كال *Picea mariana* (5)وال *Festuca pratensis* (12)وال Napier(11) grassوهذه النتائج تكون متوقعة في اغلب النباتات التي تتكاثر خضريا حيث تكون التباينات بين افراد الصنف الواحد معدومة لذلك يستخدم مؤشرات الRAPD في تشخيص تلك الاصناف (13)نستنتج من ذلك بانه يمكن تطبيق مؤشرات ال RAPD لدراسة الثبات الوراثي للنبيتات الناتجة من الكثار خارج الجسم الحي على المستوى التجاري وكجزء من برامج تطوير المحاصيل الزراعية وتكون هذه الطريقة مفيدة ايضا في المحافظة على ثبوتية الطرز الوراثية المحفوظة في البنوك الوراثية

جدول. 1:مجموعة البادئات التي اظهرت نواتج تضاعف مشتركة مع عينات الDNAالمدروسة مع تسلسلاتها وعدد القطعالمتضاعفة واحجامها .

اسم البادئ	تتابع البادئ	عدد القطع المتضاعفة	احجام القطع المتضاعفة
OPC.02	GTGAGGCGTC	3	1600,1400,900
OPC.10	TGTCTGGGTG	3	2400,900,500
OPC.12	TGTCATCCCC	4	1400,1000,850,700
OPL.03	GACTGGACAC	5	2400,2000,1100,900,600
OPN.05	ACTGAACGCC	7	2400,2000,1200,950,750,600,500
OPN.11	TCGCCGCAAA	3	2300,1600,1300
OPP.08	ACATCGCCCA	3	900,800,400
OPT.08	AACGGCGACA	5	3500,2000,1900,600,450
OPX.09	GGTCTGGTTG	4	3500,2100,1600,900
OPX.15	CAGACAAGCC	3	1400,1200,1000



شكل 1 يمثل نواتج تضاعف العينات بتطبيق مؤشرات الـ RAPD باستخدام البادئات OPT.08 و الـ OPL.03 والـ OPC.02 على التوالي

المصادر

1.Hawkes, J. G. Bethoven press. London. 259 pp . (1990).
2.Angel, F.; Barnery, V. E.; Tohme, J. and Roca, W. M.. Euphytica 90:307-313 (1996).
3.Larkin ,P.J. and W.R.Scoweroft.Somaclonal Appl.Genet.60:197-214.1981.
4.Corniquel, B. and Mercier, L. Plant Sci. 101: 163-172.(1994.)
5.Isabel, N.; Tremblay, L.; Michand, M.; Tremblay, F. M. and Bousquet, J.Theor. Appl. Genet: 86: 81-87.(1993).
6.Weigand, F.; Baum, M. and Udupa, S. Aleppo, Syria. (1993).
7.Williams, S. J. G. K.; Kubelik, H. R.; Livak, K. J.; Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535.(1990).
8.Rani,V., A.Parida,and S.N.Raina Plant cell Rep.14:459-462.(1995).
9.Ahmed, F. Theor. Appl. Genet. 98: 657-663. . (1999).
10.Rout, G. R.; Das, P.; Goel, S. and Raina, S. N Bot. Bull. Acad. Sin. 39:23-27. (1998).
11.Shenoy,V.B. and I.K.Vasil.Theor.Appl.Genet.83:947-955.(1992).
12.Valles,M.P.,Z.Y.Wang,P.Montavon,Iand G.Spangenberg.Plant cell Rep.12:101-106.(1993).
13.Kahl,G.,H.Asemota,J.Ramser,K.Weising.Euphytica 90:1-11.1996.